

Hierro, resistencia a la insulina y riesgo cardiovascular

J.M. Fernández-Real, E. Esteve y W. Ricart

Sección de Diabetes, Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario de Girona Dr. Josep Trueta. Girona. España

En los últimos años el metabolismo del hierro se ha relacionado con la resistencia a la insulina, con la diabetes mellitus tipo 2 y con los procesos de inflamación y estrés oxidativo que contribuyen al desarrollo de arteriosclerosis. Hasta hace bien poco, la sobrecarga férrica se circunscribía a la hemocromatosis y a los trastornos relacionados. El descubrimiento de las mutaciones HFE y un nuevo síndrome denominado *sobrecarga férrica asociada a insulinoresistencia* han contribuido a ampliar el conocimiento de las repercusiones que este metal posee sobre nuestra fisiología. En este artículo se revisa la influencia del metabolismo del hierro en la etiopatogenia y la expresión de diferentes procesos relacionados con la aterosclerosis y la inflamación. También se aborda el posible papel de las medidas terapéuticas que disminuyen la toxicidad del hierro en la prevención y el tratamiento de la disfunción endotelial, la diabetes mellitus y la aterosclerosis.

Palabras clave:

Hierro. Diabetes mellitus. Inflamación. Estrés oxidativo. Arteriosclerosis.

IRON, INSULIN RESISTANCE AND CARDIOVASCULAR RISK

In recent years, iron metabolism has been associated with insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, inflammation and oxidative stress, which probably contribute to the development of atherosclerosis. Until recently, knowledge of iron overload was limited to hemochromatosis and related disorders. The discovery of HFE mutations and a new syndrome of insulin-resistance-associated hepatic iron overload has contributed to widening possible new roles of this metal in our physiology. In this review, the influence of iron metabolism on the pathophysiology and clinical expression of different processes related to atherosclerosis and inflammation is briefly summarized. The possible role of decreasing iron stores in the therapy and prevention of endothelial dysfunction, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis is also reviewed.

Key words:

Iron. Diabetes mellitus. Inflammation. Oxidative stress. Atherosclerosis.

Correspondencia: Dr. J.M. Fernández-Real.
Sección de Diabetes, Endocrinología y Nutrición.
Hospital Universitario de Girona Dr. Josep Trueta.
Avda. de Francia, s/n. 17007 Girona. España.
Correo electrónico: uden.jmfernandezreal@htrueta.scs.es

Recibido el 7 de enero de 2004 y aceptado el 20 de enero de 2004.

Introducción

En los últimos años se ha ampliado considerablemente el conocimiento del papel que el hierro posee en nuestra fisiología. El hierro influye en diferentes vías metabólicas, no solamente cuando la sobrecarga de este metal es marcada (fig. 1). Probablemente existe un espectro de actuación más amplio, que se podría adquirir a partir de un umbral que se debe

definir para cada enfermedad. A continuación se revisa brevemente el metabolismo del hierro antes de abordar su influencia sobre la resistencia a la insulina, la disfunción vascular y la aterosclerosis.

Metabolismo del hierro

Existen 2 fuentes de absorción del hierro en el intestino. El hierro no hemo está presente en la dieta y en los suplementos inorgánicos, y su absorción se halla limitada por las necesidades fisiológicas de este metal. Por otra parte, el hierro en forma hemo procede de las "carne rojas", cuyo consumo se ha multiplicado en los países desarrollados, y es de absorción no limitada. El hierro plasmático se encuentra en forma de transferrina, y para su captación celular precisa un receptor específico al que unirse. El complejo transferrina-receptor posteriormente es endocitado hacia un compartimiento ácido no lisosómico, donde el hierro será utilizado para la formación de componentes celulares esenciales. El hierro no utilizado, altamente tóxico, se almacena como ferritina, que es la forma no tóxica del hierro². La ferritina es una proteína de alto peso molecular, con alta capacidad de almacenamiento del hierro (45.000 moles de hemo/mol ferritina), y multimérica, con 2 tipos de cadenas: ligeras (L) o pesadas (H). La cadena H tiene actividad ferroxidasa, y es capaz de transformar el hierro ferroso (Fe^{+2}) en férrico (Fe^{+3}), con lo que impide las reacciones oxidación/reducción que amplifican el estrés oxidativo. La oxidación del hierro se desarrolla en condiciones aeróbicas³. La ferritina, mediante sus cadenas, forma una estructura espacial en forma de cavidad en la que se deposita el hierro oxidado, con lo que evita su toxicidad sobre las células vecinas.

El hierro libre estimula la síntesis de ferritina tanto en el ámbito transcripcional como en el post-transcripcional^{4,5}. El aumento del hierro ferroso disminuye la afinidad del *iron regulatory element binding protein* (IRE-BP) al IRE de la terminación 5' del ARNm, y así desbloquea su traducción⁵. El estrés oxidativo es también capaz de facilitar la síntesis de ferritina por medio de la liberación del hierro de esta molécula, por la degradación de moléculas con grupo hemo^{6,7} y por su acción sobre el IRE-BP⁸.

Hay una serie de mecanismos que precipitarán la liberación del hierro por parte de la ferritina: la presencia de sustancias como el superóxido⁹, la disminución de la actividad ferroxidasa de la cadena H al encontrar un descenso del medio aeróbico³ y las concentraciones bajas de antioxidantes. La depleción de antioxidantes aumenta el potencial

reductor y la anaerobiosis, lo que facilita la reducción del hierro a forma ferrosa y su liberación por la ferritina⁶. El hierro liberado participa, a su vez, en la formación de radicales libres, como el ión hidroxilo, y en la peroxidación lipídica.

En resumen, la ferritina, por una parte, actúa como mecanismo protector frente a los procesos oxidativos inducidos por radicales libres¹⁰ pero, por otra, es una potencial fuente de hierro inductora de estos procesos^{3,9,11}, que determinan el daño celular.

Hierro, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2

En la bibliografía se encuentran diferentes artículos de asociación y de intervención que relacionan el metabolismo del hierro con la diabetes mellitus.

Estudios de asociación

El aumento de los depósitos de hierro es capaz de predecir el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2¹². En Estados Unidos, los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tienen un riesgo del 4,94 en varones y 3,61 en mujeres de presentar concentraciones elevadas de ferritina¹³. En sujetos sanos en esta población, el 28% de los varones y el 12,2% de las mujeres tienen depósitos elevados de hierro¹⁴. La prevalencia de hiperferritinemia en la diabetes mellitus tipo 2 varía según los diferentes trabajos de un 6,6-10%¹⁵ a un 30-50%^{16,17}, en series menos amplias. En sujetos con diabetes mellitus tipo 2 se ha encontrado un aumento de la incidencia de hemocromatosis hereditaria del 2,4% en Australia y del 1,34% en Italia^{18,19}. Por otra parte, se ha observado que la hemocromatosis contribuye al 1% de las diabetes tipo 1 de aparición tardía²⁰.

Estudios más recientes han evaluado las mutaciones HFE en diabéticos. Los sujetos homocigotos C282Y se asocian a la hemocromatosis hereditaria en un 83% de los casos y, por su parte, los heterocigotos que asocian la mutación H63D (C282Y/H63D) lo hacen con menor penetrancia. En diferentes trabajos se ha observado un aumento de la prevalencia de la mutación C282Y en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 caucásicos frente a controles^{21,22}, si bien en otros grupos no se han podido ser encontrar estos resultados²³⁻²⁶. En España, los sujetos con diabetes mellitus tipo 2 tienen un aumento de la prevalencia de la mutación H63D, que se acompaña en el 45% de los casos de hiperferritinemia²⁶. Esta misma mutación, en Portugal, se asocia a formas no clásicas de sobrecarga férrica²⁷. Sin embargo, en un reciente metaanálisis en que se estudia-

ron las mutaciones HFE no se pudo demostrar asociación significativa de estas mutaciones con la diabetes mellitus tipo 2²⁸. También hay que tener en cuenta que al evaluar los depósitos de hierro surge el problema de que no se conoce con exactitud el límite entre lo que se considera acumulación o cifras normales de hierro; de hecho sólo el 8-20% de los heterocigotos para la hemocromatosis tienen valores por encima del percentil 95 con respecto a los controles²⁹.

En los últimos años se ha descrito un nuevo síndrome de sobrecarga hepática de hierro (IR-HIO) que cursa con hiperferritinemia y saturación normal de transferrina, no ligado al antígeno HLA-A3 ni a la hemocromatosis clásica y que se asocia al síndrome metabólico, a la esteatohepatitis no alcohólica y a la diabetes mellitus tipo 2³⁰⁻³². En la IR-HIO el depósito de hierro ocurre en los hepatocitos y, con más frecuencia, se localiza en las células de los sinusoides, a diferencia de la hemocromatosis. Estos depósitos incrementados abocan a la esteatosis y a la inflamación³³, con un aumento del riesgo de fibrosis, que ocurre hasta en el 60% de los casos.

La ferritina en sujetos con diabetes mellitus tipo 2 es capaz de predecir la hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}), con independencia de la glucemia basal³⁴. En pacientes con diabetes tipo 1 y 2, el mal control metabólico se asocia a la ferritina plasmática^{16,17,35}. En la diabetes gestacional la concentración de ferritina sérica y el índice de masa corporal (IMC) son factores predictivos independientes de la glucemia, a las 2 h tras sobrecarga oral de glucosa^{36,37}. Incluso en sujetos sanos los valores de ferritina se correlacionan con la glucemia basal y el área de glucosa bajo la curva, tras una sobrecarga oral de glucosa^{34,38}.

La interacción de los depósitos de hierro con el metabolismo de la glucosa se produce, fundamentalmente, a través de la resistencia a la insulina. Los depósitos de hierro se han asociado a diferentes componentes del síndrome de resistencia a la insulina o síndrome metabólico. Por ejemplo, la concentración de ferritina sérica se relaciona con la distribución central de la grasa corporal y con otras medidas de obesidad³⁹. Del mismo modo, también se ha correlacionado la ferritina sérica con la presión arterial diastólica, incluso ajustando por el IMC. Es interesante reseñar, en este sentido, que la flebotomía reduce los depósitos de hierro en paralelo a su efecto beneficioso sobre la hipertensión arterial refractaria⁴⁰ y la postransplante⁴¹. Otros componentes del síndrome metabólico asociados a la ferritinemia son el ácido úrico, el colesterol ligado a las lipoproteínas de alta densidad

(cHDL) y la ratio HDL2/HDL3, estos 2 últimos en correlación inversa³⁴. Pero los estudios que más claramente han demostrado la asociación del hierro con la sensibilidad a la insulina han sido los llevados a cabo mediante pinzamiento euglicémico⁴² y *minimal model*^{43,44}, que asocian la acción de la insulina con la ferritina sérica incluso en sujetos no diabéticos y que no toleran la glucosa. Algo similar sucede en situaciones de sobrecarga férrica, como la hemosiderosis⁴³ y la β -talasemia⁴⁴.

Esta asociación entre los depósitos de hierro y la resistencia a la acción de la insulina se produce preferentemente en los cuartiles superiores de concentración de ferritina sérica^{34,38}, por lo que se pierde la correlación en los sujetos con depósitos bajos de hierro, lo que lleva de nuevo a la pregunta de qué cifra de ferritina se debe considerar como elevada y, por tanto, de riesgo significativo cardiovascular.

El efecto de los depósitos de hierro sobre la sensibilidad a la insulina parece localizarse fundamentalmente en el hígado⁴⁵. Así, el exceso de depósitos de hierro en el hígado conduce a una metabolización reducida de la insulina y da lugar a hiperinsulinismo⁴⁶, y a una acción insulínica reducida, con supresión parcial de la producción hepática de glucosa. Del mismo modo, también se ha observado una acumulación de hierro en el tejido muscular esquelético⁴⁷ que, como se conoce, participa de manera crucial en la etiopatogenia de la insulinorresistencia⁴⁸. Por otra parte, existe alguna evidencia que indica que el hiperinsulinismo, a su vez, podría actuar sobre la producción de ferritina, como ocurre en modelos experimentales sobre células de rata, donde la insulina induce la transcripción del ARNm de la ferritina⁴⁹. Tampoco hay que olvidar en esta asociación el efecto de estrés oxidativo, que también podría contribuir al hiperinsulinismo, al disminuir la internalización de la insulina en las células endoteliales⁵⁰.

A pesar de que el efecto del hierro parece que se circunscribe preferentemente sobre la acción de la insulina, existen varios trabajos que indican un aumento del ARNm de la ferritina en ratas a las que se les infunde glucosa⁵¹ y un aumento de la masa de células β en pacientes con sobrecarga férrica⁵², lo que podría indicar un efecto directo del hierro sobre la insulinosécración.

Estudios de intervención

También han demostrado la relación entre el hierro y la diabetes mellitus tipo 2. Se puede observar cómo las donaciones frecuentes de sangre constituyen un mecanismo protector para el desa-

rrollo de la diabetes mellitus tipo 2, tanto en humanos⁵³ como en modelos de experimentación con ratas⁵⁴.

Por otra parte, la flebotomía en sujetos con diabetes mellitus tipo 2 conlleva la mejora del control metabólico y la concentración de HbA_{1c}⁵⁵⁻⁵⁷, así como la disminución del colesterol total, los triglicéridos séricos y las Apo B⁵⁶⁻⁶¹. De hecho, en algún artículo hasta el 45% de los pacientes diabéticos con hemocromatosis mejora su control metabólico tras flebotomía⁶², y se consigue un descenso de los requerimientos de insulina que, en algún caso, ha permitido su retirada^{57,61}. También se ha podido comprobar que la flebotomía disminuye la insulinoresistencia en sujetos diabéticos con hiperferritinemia sin hemocromatosis. En un estudio reciente se ha podido comprobar cómo la flebotomía, que condujo a la extracción de 1.500 ml de sangre, determinó una mejoría en la sensibilidad a la insulina y a una disminución en la secreción de C-péptido en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y concentraciones de ferritina elevadas⁶³.

El uso de desferroxamina, quelante del hierro, normalizó los parámetros de estrés oxidativo y la glucosilación en ratas con diabetes⁶⁴. En pacientes con diabetes mellitus tipo 2 e hiperferritinemia, la desferroxamina mejoró el control metabólico (glucemia y HbA_{1c})^{65,66} y también produjo una disminución en las cifras de triglicéridos plasmáticos⁶⁵.

En resumen, los estudios de asociación e intervención sugieren que existe una relación importante entre la sobrecarga férrica y la diabetes mellitus tipo 2, y la resistencia a la insulina es el probable nexo de unión entre ambas enfermedades.

Hierro, disfunción endotelial y estrés oxidativo

El estrés oxidativo induce insulinoresistencia por disminución de la internalización de la insulina⁵⁰ e induce la síntesis de ferritina, directa o indirectamente, al facilitar la liberación de hierro de la propia ferritina⁶ o de otras moléculas con grupo hemo. La liberación del hierro aumenta, a su vez, el estrés oxidativo, ya que es un oxidante que con-

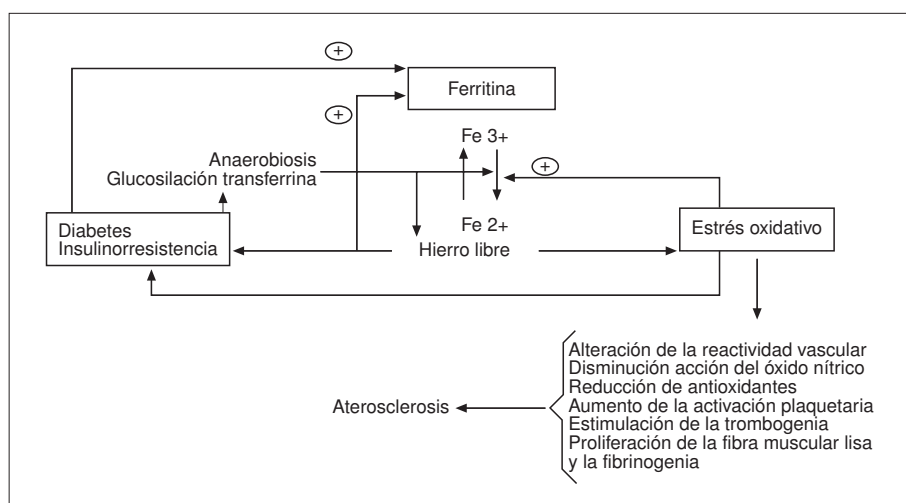


Figura 1. Esquema de la interacción del metabolismo del hierro con la diabetes mellitus y la aterosclerosis.

vierte radicales libres poco reactivos como el H₂O₂ en OH⁻ y O₂.

En la diabetes mellitus tipo 2 todo este proceso se exagera debido a la glucosilación proteínica y a la pseudohipoxia, lo que determina la modificación oxidativa de diferentes lípidos y proteínas⁶⁷. La glucosilación de la transferrina determina que disminuya la capacidad de unión al hierro⁶⁸, lo que facilita también la producción de hierro libre y la síntesis de ferritina. La holotransferrina glucosilada facilita la producción de radicales libres de oxígeno, como el propio ión hidroxilo⁶⁸.

Los radicales libres y la oxidación empeoran los mecanismos de vasodilatación dependientes de endotelio⁶⁹⁻⁷², reducen por consumo los antioxidantes endógenos, como el ácido ascórbico⁷³, y producen disfunción endotelial. La reposición de los antioxidantes mejora el daño endotelial⁷⁴⁻⁷⁸. Se ha observado una relación competitiva entre el óxido nítrico (NO) y el anión superóxido en el endotelio.

El uso de quelantes del hierro mejora la vasodilatación dependiente del endotelio, tanto en modelos animales⁷⁹ como en sujetos con diabetes mellitus tipo 2⁸⁰ y en pacientes con enfermedad coronaria⁸¹. Del mismo modo, la flebotomía mejora la reactividad vascular de manera paralela al descenso de la saturación de transferrina, la HbA_{1c} y la hemoglobina total, en pacientes con diabetes mellitus tipo 2⁸², lo que indica la importancia de los metales localizados en el compartimento sanguíneo.

Hierro y enfermedad cardiovascular

La peroxidación lipídica y la alteración de la reactividad vascular por el aumento de los depósi-

tos de hierro pueden justificar un aumento del riesgo cardiovascular. Se produce un aumento de la expresión del gen de la ferritina en las placas de ateroma⁸³, así como un significativo aumento de los depósitos de hierro⁸⁴ y de la cadena ligera de ferritina en las arterias coronarias de pacientes con cardiopatía isquémica en estudios anatomopatológicos⁸⁵. En sujetos con hemocromatosis se observa una hipertrofia de la pared vascular y un descenso de la distensibilidad, que es reversible tras la depleción de hierro⁸⁶. El hierro induce fibrogenia y proliferación de células musculares lisas y es inhibido por los quelantes⁸⁷. La activación plaquetaria y la trombogénesis están aumentadas en ratones tratados crónicamente con hierro⁸⁸. La sobrecarga férrica también aumenta el daño miocárdico causado por la anoxia y la reperfusión⁸⁹. De hecho, la restricción dietética de hierro contribuye a la estabilización de las placas de ateroma en modelos experimentales⁹⁰.

Al evaluar el efecto de la sobrecarga férrica sobre la aterosclerosis hay que tener en cuenta la relación que mantiene con la resistencia a la insulina y con la inflamación. La ferritina no sólo se asocia al síndrome metabólico sino que también se correlaciona con el grado de inflamación cuantificada mediante la concentración de proteína C reactiva⁹¹. La inflamación, a su vez, aumenta los receptores de transferrina y favorece la internalización y la acumulación de los depósitos de hierro⁹², con lo que se incrementa la producción de ferritina⁹³. De hecho, la asociación de inflamación con el riesgo cardiovascular es bien conocida⁹⁴.

En la bibliografía encontramos diferentes estudios que han intentado asociar la sobrecarga férrica a la aterosclerosis con diferentes resultados. En los estudios de cohortes en 2 poblaciones europeas se ha encontrado asociación entre los depósitos de hierro y el riesgo de enfermedad cardiovascular^{95,96}. Esta relación es más fuerte en los sujetos con cifras elevadas de colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), donde la sobrecarga férrica aumenta hasta 2 veces el riesgo cardiovascular. Sin embargo, en otros trabajos esta asociación no se ha podido documentar, y gran parte de ellos se han realizado en población americana y australiana⁹⁷⁻¹⁰⁰. En los estudios de casos y controles también se ha hallado disparidad de resultados; así, en unos casos se ha observado relación hierro-aterosclerosis^{101,102} mientras que en otros no^{103,104}. En un meta-análisis de diferentes estudios la ferritina tampoco se ha podido correlacionar con el riesgo cardiovascular¹⁰⁵. En estudios angiográficos, la ferritina se ha asociado con aterosclerosis coronaria en ciertas

poblaciones, como la iraní¹⁰⁶, mientras que no lo ha hecho en europeas ni americanas^{104,107}.

Otros autores han evaluado la influencia de las mutaciones HFE ligadas a la hemocromatosis con la aterosclerosis. Los sujetos con la mutación C282Y y los heterocigotos C282Y/H63D presentan un aumento del riesgo cardiovascular en diferentes estudios¹⁰⁸⁻¹¹⁰, asociación que no se ha conseguido demostrar en otros trabajos¹¹¹⁻¹¹².

Finalmente, la discrepancia en los resultados también se produce en los estudios de intervención en donantes de sangre. Dos grupos diferentes han estudiado la relación existente entre la donación sanguínea, que disminuye los depósitos de hierro, y el riesgo cardiovascular. En estos estudios, tras corregir por los factores de riesgo cardiovascular clásicos, los donantes parecían tener un significativo descenso del riesgo de infarto de miocardio en comparación con los controles¹¹³⁻¹¹⁴. No obstante, en estos ensayos se incluyó a pacientes con cardiopatía coronaria previa, lo que podría influir en los resultados. En población americana, en el estudio PSF, realizado en 40.000 pacientes, no se halló asociación entre las donaciones de sangre con una disminución del riesgo de cardiopatía isquémica⁵³. En este último estudio, la ingesta de complejos vitamínicos y aspirina podría, en parte, explicar la discordancia de los resultados con los estudios europeos.

Por otra parte, no se ha encontrado asociación entre la sobrecarga férrica y la incidencia de accidentes cerebrovasculares¹⁰⁰, pero sí correlación con el tamaño y la gravedad de los infartos^{115,116}. En modelos animales, el tratamiento con desferroxamina reduce las lesiones causadas por isquemia cerebral en ratas¹¹⁷. Tampoco existe asociación entre las mutaciones HFE (C282Y y H63D) y la incidencia de ictus¹¹⁸. Al evaluar como parámetro la aterosclerosis carotídea asintomática mediante ecografía, encontramos estudios de casos y controles¹⁰¹ y de cohortes⁹⁶ en los que la sobrecarga férrica se asocia con un aumento de la incidencia y la progresión de las placas carotídeas de ateroma. Sin embargo, estos datos no se han confirmado en otros trabajos^{103,119}.

También se ha estudiado la ingesta de hierro como posible marcador de riesgo cardiovascular. En mujeres mayores de 60 años¹²⁰ y en sujetos con mayor ingesta semanal de carne roja¹²¹ existe un aumento de la incidencia de cardiopatía isquémica, aunque otros autores no han podido ratificar estos resultados^{102,122} quizá, en parte, porque en las encuestas de ingesta de hierro no se separó el hierro no hemo del hemo; este último está presente en la carne roja y es de absorción no limitada.

En resumen, los datos obtenidos al evaluar la influencia del hierro sobre el desarrollo y expresividad clínica de la arteriosclerosis son, hasta cierto punto, contradictorios. La estrecha relación que existe entre la sobrecarga férrica, la resistencia a la insulina, la diabetes mellitus tipo 2 y la inflamación podría dificultar la interpretación de los diferentes análisis estadísticos.

Bibliografía

- Turlin B, Mendler MH, Moirand R, Guyader D, Guillygomarc'h A, Deugnier Y. Histologic features of the liver in insulin resistance-associated iron overload. *Am J Clin Pathol* 2001;116:263-70.
- Theil, EC. Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *J Biol Chem* 1990;265:4771-4.
- Ellervik C, Mandrup-Poulsen T, Nordestgaard BG, Larsen LE, Appleyard M, Frandsen M, et al. Prevalence of hereditary hemochromatosis in late-onset type 1 diabetes mellitus: a retrospective study. *Lancet* 2001;358:1405-9.
- Balla J, Nath KA, Balla G, Juckett MB, Jacob HS, Vercellotti GM. Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction in rat lung by hemoglobin in vivo. *Am J Physiol* 1995;268:L321-7.
- Cairo G, Tacchini L, Pogliaghi G, Anzon E, Tomasi A, Bernelli-Zazzera A. Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. *J Biol Chem* 1995;270:700-3.
- Reif DW. Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Rad Biol Med* 1992;12:417-27.
- Qi Y, Jamindanar TM, Dawson G. Hypoxia alters iron homeostasis and induces ferritin synthesis in oligodendrocytes. *J Neurochem* 1995;64:2458-64.
- Van Lenten BJ, Prieve J, Navab M, Hama S, Lusis AJ, Fogelman AM. Lipid-induced changes in intracellular iron homeostasis in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1995;95:2104-10.
- Thomas CE, Morehouse LA, Aust SD. Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1985;260:3275-80.
- Juckett MB, Balla J, Balla G, Jessurun J, Jacob HS, Vercellotti GM. Ferritin protects endothelial cells from oxidized low density lipoprotein in vitro. *Am J Pathol* 1995;147:782-9.
- Aust SD. Ferritin as a source of iron and protection from iron-induced toxicities. *Toxicol Lett* 1995;82/83:941-4.
- Salonen JT, Tuomainen T-P, Nyyssönen K, Lakka H-M, Punnonen K. Relation between iron stores and non-insulin-dependent diabetes in men: case-control study. *BMJ* 1999;317:727-30.
- Ford ES, Cogswell ME. Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care* 1999;22:1978-83.
- Fleming DJ, Jacques PF, Tucker KL, Massaro JM, D'Agostino RB, Wilson PWF, et al. Iron status of the free-living, elderly Framingham Heart Study cohort: an iron-replete population with a high prevalence of elevated iron stores. *Am J Clin Nutr* 2001;73:638-46.
- O'Brien T, Basset B, Burray DM, Dinneen S, O'Sullivan DJ. Usefulness of biochemical screening of diabetic patients for hemochromatosis. *Diabetes Care* 1990;13:532-4.
- Kaye TB, Guay AT, Simonson DC. Non-insulin-dependent diabetes mellitus and elevated serum ferritin level. *J Diabetes Complications* 1993;7:246-9.
- Gallou G, Guilhem I, Poirier JY, Ruelland A, Legras B, Cloarec L. Increased serum ferritin in insulin-dependent diabetes mellitus: relation to glycemic control. *Clin Chem* 1994;40:947-8.
- Phelps G, Chapman I, Hall P, Braund W, Mackinnon M. Prevalence of genetic hemochromatosis among diabetic patients. *Lancet* 1989;2:233-4.
- Conte D, Manachino D, Colli A, Guala A, Aimo G, Andreolletti M. Prevalence of genetic hemochromatosis in a cohort of Italian patients with diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1998;128:370-3.
- Ellervik C, Mandrup-Poulsen T, Nordestgaard BG, Larsen LE, Appleyard M, Frandsen M, et al. Prevalence of hereditary hemochromatosis in late-onset type 1 diabetes mellitus: a retrospective study. *Lancet* 2001;358:1405-9.
- Kwan T, Leber B, Ahuja S, Carter R, Gerstein H. Patients with type 2 diabetes have a high frequency of the C282Y mutation of the hemochromatosis gene. *Clin Invest Med* 1998;21:251-7.
- Moczulski DK, Grzeszczak W, Gawlik B. Role of hemochromatosis C282Y and H63D mutations in HFE gene in development of type 2 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2001;24:1187-91.
- Frayling T, Ellard S, Grove J, Walker M, Hattersley AT. C282Y mutation in HFE (haemochromatosis) gene and type 2 diabetes. *Lancet* 1998;351:1933-4.
- Braun J, Donner H, Plock K, Rau H, Usadel KH, Badenhop K. Hereditary hemochromatosis mutations (HFE) in patients with type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 1998;41:983-4.
- Dubois-Laforgue D, Caillat-Zucman S, Djilali-Saiah I, Larger E, Mercadier A, Boitard C. Mutations in HFE, the hemochromatosis candidate gene, in patients with NIDDM. *Diabetes Care* 1998;21:1371-2.
- Fernández-Real JM, Vendrell J, Baiget M, Gimferrer E, Ricart W. C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis candidate gene in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:525-6.
- Porto G, Alves H, Rodrigues P, Cebada JM, Portal C, Ruivo A, et al. Major histocompatibility complex class I associations in iron overload: evidence for a new link between the HFE H63D mutation, HLA-A29, and non-classical forms of hemochromatosis. *Immunogenetics* 1998;47:404-10.
- Halsall DJ, McFarlane I, Luan J, Cox TM, Wareham NJ. Typical type 2 diabetes mellitus and HFE gene mutations: a population-based case-control study. *Hum Mol Genet* 2003;12:1361-5.
- Bulaj ZB, Griffen LM, Jorde LB, Edwards CQ, Kushner JP. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *N Engl J Med* 1996;335:1799-805.
- Moirand R, Mortaji A, Loréal O, Paillard F, Brissot P, Deugnier Y. A new syndrome of liver iron overload with normal transferrin saturation. *Lancet* 1997;349:95-7.
- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M. Nonalcoholic fatty liver disease. A feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-50.
- Mendler M, Turlin B, Moirand R, Jouanolle AM, Sapey T, Guyader D. Insulin resistance-associated iron overload. *Gastroenterology* 1999;117:1155-63.
- Turlin B, Mendler MH, Moirand R, Guyader G, Guillygomarc'h A, Deugnier Y. Histologic features of the liver in insulin resistance-associated iron overload. *Am J Clin Pathol* 2001;116:263-70.
- Fernández-Real JM, Ricart W, Arroyo E, Balança R, Casamitjana R, Cabrero D. Serum ferritin as a component of the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 1998;21:62-8.
- Mauricio D, Pérez A, Riera A, Arroyo JA, De Leiva A, Gimferrer E. Serum parameters of iron metabolism in type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *Diab Nutr Metab* 1993;8:315-6.
- Lao TTK. Maternal serum ferritin and gestational impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 1997;20:1368-69.
- Lao TTK, Tam KF. Gestational diabetes mellitus in the last trimester. A feature of maternal iron excess? *Diabetic Med* 2001;18:218-23.
- Tuomainen T-P, Nyyssönen K, Salonen R, Tervahauta A, Korpe-la H, Lakka T. Body iron stores are associated with serum insulin and blood glucose concentrations. *Diabetes Care* 1997;20:426-8.
- Gillum RF. Association of serum ferritin and indices of body fat distribution and obesity in Mexican American men. The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Int J Obes Rel Metab Dis* 2001;25:639-45.
- Zidek W, Tenschert W, Karoff C, Vetter H. Treatment of resistant hypertension by phlebotomy. *Klin Wochenschr* 1985;63:762-4.
- Barenbrock M, Spieker C, Rahn KH, Zidek W. Therapeutic efficiency of phlebotomy in posttransplant hypertension associated with erythrocytosis. *Clin Nephrol* 1993;40:241-3.
- Merkel PA, Simonson DC, Amiel SA, Plewe G, Sherwin RS, Pearson HA. Insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with thalassemia major treated by hypertransfusion. *N Engl J Med* 1988;318:809-14.
- Dmochowski K, Finegood DT, Francombe W, Tyler B, Zinman B. Factors determining glucose tolerance in patients with thalassemia major. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:478-83.

44. Cavallo-Perin P, Pacini G, Cerutti F, Bessone A, Condo C, Sacchetti L. Insulin resistance and hyperinsulinemia in homozygous β -thalassemia. *Metabolism* 1995;44:281-6.
45. Dandona P, Hussain MAM, Varghese Z, Politis D, Flynn DM, Hoffbrand AV. Insulin resistance and iron overload. *Ann Clin Biochem* 1983;20:77-9.
46. Niederau C, Berger M, Stremmel W, Starke A, Strohmeyer G, Ebert R, et al. Hyperinsulinemia in non-cirrhotic haemochromatosis: Impaired hepatic insulin degradation? *Diabetologia* 1984; 26:441-4.
47. Shafer AI, Cheron RG, Dluhy R, Cooper B, Gleason RE, Soeldner JS, et al. Clinical consequences of acquired transfusional iron overload in adults. *N Engl J Med* 1981;304:319-24.
48. Katz LD, Glickman MG, Rapoport S, Ferrannini E, DeFronzo RA. Splanchnic and peripheral glucose disposal of oral glucose in man. *Diabetes* 1983;32:675-9.
49. Yokomori N, Iwasa Y, Aida K, Inoue M, Tawata M, Onaya T. Transcriptional regulation of ferritin messenger ribonucleic acid levels by insulin in cultured rat glioma cells. *Endocrinology* 1991; 128:1474-80.
50. Bertelsen M, Ånggård EE, Carrier MJ. Oxidative stress impairs insulin internalization in endothelial cells in vitro. *Diabetologia* 2001;44:605-13.
51. MacDonald MJ, Cook JD, Epstein ML, Flowers CH. Large amount of (apo) ferritin in the pancreatic insulin cell and its stimulation by glucose. *FASEB J* 1994;8:777-81.
52. Rahier JR, Loozen S, Goebbels RM, Abraham M. The hemochromatotic human pancreas: a quantitative immunohistochemical and ultrastructural study. *Diabetologia* 1987;30:5-12.
53. Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci E, Willett WC, Stampfer MJ. Blood donations and risk of coronary heart disease in men. *Circulation* 2001;103:52-7.
54. Yale JF, Grose M, Seemayer TA, Marliss EB. Diabetes prevention in BB rats by frequent blood withdrawal started at a young age. *Diabetes* 1988;37:327-33.
55. Bofill C, Joven J, Bages J, Vilella E, Sans T, Cavallé P, et al. Response to repeated phlebotomies in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1994;43:614-20.
56. Eschwege E, Saggi R, Wacjman H, Levy R, Thibault N, Duchateau A. Haemoglobin A_{1c} in patients on venesection therapy for haemochromatosis. *Diabetes Metab* 1982;8:137-40.
57. Dymock IW, Cassar J, Pyke DA, Oakley WG, William SR. Observations on the pathogenesis, complications and treatment of diabetes in 115 cases of hemochromatosis. *Am J Med* 1972;203-10.
58. Davis WD, Arrowsmith WR. The treatment of haemochromatosis by massive venesection. *Ann Intern Med* 1953;39:723-34.
59. Edwards CQ, Cartwright GE, Skolnick MH, Amos DB. Homozygosity for hemochromatosis: Clinical manifestations. *Ann Intern Med* 1980;93:519-25.
60. Powell LW, Kerr JFR. Reversal of 'cirrhosis' in idiopathic haemochromatosis following long-term intensive venesection therapy. *Australas Ann Med* 1970;1:54-7.
61. Williams R, Smith PM, Spicer EJF, Barry M, Sherlock S. Venesection therapy in idiopathic haemochromatosis. An analysis of 40 treated and 18 untreated patients. *Q J Med* 1969;149:1-16.
62. Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, Stremmel W, Trampisch HJ, Strohmeyer G. Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 1985;313:1256-62.
63. Fernández-Real JM, Peñarroja G, Castro A, García-Bragado F, Hernández I, Ricart W. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes mellitus. Effects on insulin sensitivity and β -cell function. *Diabetes* 2002;51:1000-4.
64. Young IS, Tate S, Lightbody JH, McMaster D, Trimble ER. The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Radical Biol Med* 1995;18: 833-40.
65. Cutler P. Deferrioxamine therapy in high-ferritin diabetes. *Diabetes* 1989;38:1207-10.
66. Redmon JB, Pyzdrowski KL, Robertson RP. No effect of deferoxamine therapy on glucose homeostasis and insulin secretion in individuals with NIDDM and elevated serum ferritin. *Diabetes* 1993;42:544-9.
67. Sakurai T, Kimura S, Nakano M, Kimura H. Oxidative modification of glycated low density lipoprotein in the presence of iron. *Biochem Biophys Res Comm* 1991;177:433-9.
68. Fujimoto S, Kawakami N, Ohara A. Nonenzymatic glycation of transferrin: decrease of iron-binding capacity and increase of oxygen radical production. *Biol Pharm Bull* 1995;18:396-400.
69. Graier WF, Simecek S, Kukovetz WR, Kostner GM. High D-glucose-induced changes in endothelial Ca²⁺/EDRF signaling are due to generation of superoxide anions. *Diabetes* 1996;45:1386-95.
70. Hunt JV, Smith CCT, Wolff SP. Autooxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 1990;39:1420-4.
71. Jain SK. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J Biol Chem* 1989;264:21340-5.
72. Wolff SP, Dean RT. Glucose autooxidation and protein modification. The potential role of oxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J* 1987;245:243-50.
73. Yue DKS, McLennon S, Fisher E, Heffernan S, Capogreco C, Ross GR. Ascorbic acid status and polyol pathway in diabetes. *Diabetes* 1989;38:257-61.
74. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992; 263:H321-6.
75. Diederich DJ, Skopec J, Diederich A, Dai F. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals. *Am J Physiol* 1994;266:H1153-61.
76. Ting HH, Timini FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilatation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1996;97:22-8.
77. Langenstroer P, Pieper GM. Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 1992;263:H257-65.
78. Hattori YH, Kawasaki H, Kazuhiro A, Kanno M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol* 1991;261:H1086-94.
79. Pieper GM, Siebeneich W. Diabetes-induced endothelial dysfunction is prevented by long-term treatment with the modified iron chelator, hydroxyethyl starch conjugated-deferoxamine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;30:734-8.
80. Nitenberg A, Ledoux S, Valensi P, Sachs R, Antony I. Coronary microvascular adaptation to myocardial metabolic demand can be restored by inhibition of iron-catalyzed formation of oxygen free radicals in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2002;51:813-8.
81. Duffy SJ, Biegelsen ES, Holbrook M, Russell JD, Gokce JK Jr. Iron chelation improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;103:2799-804.
82. Fernández-Real JM, Peñarroja G, Castro A, García-Bragado F, Ricart W. Blood letting in high ferritin type 2 diabetes: effects on vascular reactivity. *Diabetes Care* 2002;25:2249-55.
83. Pang J, Jiang MJ, Chen YL, Wang FW, Wang DL, Chu SH. Increased ferritin gene expression in atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1996;97:2204-12.
84. Thong PSP, Selley M, Watt F. Elemental changes in atherosclerotic lesions using nuclear microscopy. *Cell Mol Biol* 1996;42:103-10.
85. You SA, Archacki SR, Angheliu G, Moravec CS, Rao S, Kinter M, et al. Proteomic approach to coronary atherosclerosis shows ferritin light chain as a significant marker: evidence consistent with iron hypothesis in atherosclerosis. *Physiol Genomics* 2003; 13:25-30.
86. Failla M, Giannattasio C, Piperno A, Vergani A, Grappiolo A, Gentile G, et al. Radial artery wall alterations in genetic hemochromatosis before and after iron depletion therapy. *Hepatology* 2000;32:569-73.
87. Porreca E, Ucchino S, Di Febbo C, Di Bartolomeo N, Angelucci D, Napolitano AM, et al. Antiproliferative effect of desferrioxamine on vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:299-304.
88. Day SM, Duquaine D, Mundada LV, Menon RG, Khan BV, Rajagopalan S, et al. Chronic iron administration increases vascular oxidative stress and accelerates arterial thrombosis. *Circulation* 2003;107:2601-6.

89. McCord JM. Is iron sufficiency a risk factor in ischemic heart disease? *Circulation* 1991;83:1112-4.
90. Lee HT, Chiu LL, Lee TS, Tsai HL, Chau LY. Dietary iron restriction increases plaque stability in apolipoprotein-E-deficient mice. *J Biomed Sci* 2003;10:510-7.
91. Williams MJ, Poulton R, Williams S. Relationship of serum ferritin with cardiovascular risk factors and inflammation in young men and women. *Atherosclerosis* 2001;165:179-84.
92. Hirayama M, Kohgo Y, Kondo H, Shintani N, Fujikawa K, Sasaki K, et al. Regulation of iron metabolism in HepG2 cells: a possible role for cytokines in the hepatic deposition of iron. *Hepatology* 1993;18:874-80.
93. Rogers JT. Ferritin translation by interleukin-1 and interleukin-6: the role of sequences upstream of the start codons of the heavy and light subunit genes. *Blood* 1996;87:2525-37.
94. Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon. *Circulation* 1999;100:96-102.
95. Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, Toumilehto J, Seppanen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation* 1992;86:803-11.
96. Kiechl S, Willeit JU, Egger G, Poewe W, Oberholzer F. Body iron stores and the risk of carotid atherosclerosis. *Circulation* 1997;96:3300-7.
97. Sempos CT, Looker AC, Gillum RF, McGee DL, Young CV, Johnson CL. Serum ferritin and death from all causes and cardiovascular disease: the NHANES II mortality study. *An Epidemiol* 2000;10:441-8.
98. Stampfer MJ, Grodstein F, Rosenberg I, Willet W, Hennekens C. A prospective study of plasma ferritin and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1993;87:688.
99. Manttari M, Manninen V, Huttunen JK, Palosuo T, Ehnholm C, Heinonen OP. Serum ferritin and ceruloplasmin as coronary risk factors. *Eur Heart J* 1994;15:1599-603.
100. Knuiman MW, Divitini ML, Olynyk JK, Cullen DJ, Bartholomew HC. Serum ferritin and cardiovascular disease: a 17-year follow-up study in Busselton, Western Australia. *Am J Epidemiol* 2003;158:144-9.
101. Kiechl S, Aichner F, Gerstenbrand F, Egger G, Mair A, Rungger G. Body iron stores and presence of carotid atherosclerosis. Results from the Bruneck Study. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1625-30.
102. Morrison HI, Semenciw RM, Mao Y, Wigle DT. Serum iron and fatal acute myocardial infarction. *Epidemiology* 1994;5:243-6.
103. Moore M, Folsom AR, Barnes RW, Eckfeldt JH. No association between serum ferritin and asymptomatic carotid atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Epidemiol* 1995;141:719-23.
104. Eichner JE, Qi H, Moorre WE, Schechter E. Iron measures in coronary angiography patients. *Atherosclerosis* 1998;136:241-5.
105. Danesh J, Appleby P. Coronary heart disease and iron status: meta-analyses of prospective studies. *Circulation* 1999;99:852-4.
106. Haidari M, Javadi E, Sanati A, Hajilooi M, Ghanbili J. Association of increased ferritin with premature coronary stenosis in men. *Clin Chem* 2001;47:1666-72.
107. Bozzini C, Girelli D, Tinazzi E, Olivieri O, Stranieri C, Bassi A, et al. Biochemical and genetic markers of iron status and the risk of coronary artery disease: an angiography-based study. *Clin Chem* 2002;48:622-8.
108. Roest M, Van der Schou Y, De ValK B, Marx MJJ, Tempelman MJ, De Groot PG. Heterozygosity for a hereditary hemochromatosis gene is associated with cardiovascular death in women. *Circulation* 1999;100:1268-73.
109. Toumainen TP, Kontula K, Nyyssonen K, Lakka TA, Helio T, Salonen JT. Increased risk of acute myocardial infarction in carriers of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation. *Circulation* 1999;100:1274-9.
110. Waalen J, Felitti V, Gelbart T, Ngoc JH, Beutler E. Prevalence of coronary disease associated with HFE mutations in adults attending a health appraisal center. *Am J Med* 2002;113:472-9.
111. Battiloro E, Ombres D, Pascale E, D'Ambrosio E, Verna R, Arca M. Hemochromatosis gene mutations and risk of coronary artery disease. *Eur J Hum Genet* 2000;8:389-92.
112. Hetet G, Elbaz A, Garipey J, Nicaud V, Arveiler D, Morrison C. Association studies between haemochromatosis gene mutations and the risk of cardiovascular diseases. *Eur J Clin Invest* 2001;31:382-8.
113. Meyers DG, Strickland D, Maloley PA. Possible association of reduction in cardiovascular events with blood donation. *Heart* 1997;78:188-93.
114. Salonen JT, Toumainen TP, Salonen R. Donation of blood is associated with reduced risk of myocardial infarction: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Epidemiol* 1998;148:445-51.
115. Dávalos A, Fernández-Real JM, Ricart W, Molins A, Planas E, Genís D. Iron related damage in acute ischemic stroke. *Stroke* 1994;25:1543-6.
116. Erdemoglu AK, Ozbakir S. Serum ferritin levels and early prognosis of stroke. *Eur J Neurol* 2002;9:663-7.
117. Palmer C, Roberts RL, Bero C. Desferoxamine posttreatment reduces ischemic brain injury in neonatal rats. *Stroke* 1994;25:1039-45.
118. Njajou OT, Hollander M, Koudstaal PJ, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM, et al. Mutations in the hemochromatosis gene (HFE) and stroke. *Stroke* 2002;33:2363-6.
119. Rauramaa R, Vaisanen S, Mercuri M, Rankinen T, Penttila I, Bond MG. Association of risk factors and body iron status to carotid atherosclerosis in middle-aged eastern Finnish men. *Eur Heart J* 1994;15:1020-7.
120. Tzonou A, Lagiou P, Trichopoulou A, Tsoutsos V, Trichopoulos D. Dietary iron and coronary heart disease risk: a study from Greece. *Am J Epidemiol* 1998;147:161-6.
121. Snowdon DA, Phillips RL, Fraser GA. Meat consumption and fatal ischemic heart disease. *Prev Med* 1984;13:490-500.
122. Liao Y, Cooper RS, McGee DL. Iron status and coronary heart disease: negative findings from the NHANES I Epidemiologic Follow up Study. *Am J Epidemiol* 1994;139:704-12.